

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/EP05/002198

International filing date: 02 March 2005 (02.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: DE
Number: 10 2004 010 928.1
Filing date: 05 March 2004 (05.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 23 March 2005 (23.03.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

15. MAR 2005



EP05 / 2198

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 10 2004 010 928.1

Anmeldetag: 05. März 2004

Anmelder/Inhaber: SIRS-Lab GmbH, 07745 Jena/DE

Bezeichnung: Protein zur Bindung prokaryonter DAN sowie Verfahren zur Trennung und Anreicherung prokaryonter DNA

IPC: C 07 K, C 12 N

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 3. März 2005
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Patentamt

**Protein zur Bindung prokaryonter DNA sowie Verfahren zur Trennung und
Anreicherung prokaryonter DNA**

Die Erfindung betrifft ein Protein, das nicht methylierte Cytidin-Phosphat-Guanosin-Dinukleotide (CpG-Motive) einer DNA bindet, eine dafür kodierende Nukleinsäure, ein Verfahren unter Verwendung des erfindungsgemäßen Proteins zur Trennung und/oder Anreicherung prokaryonter DNA bzw. zur Abreicherung dieser DNA aus physiologischen Flüssigkeiten sowie einen Kit zur Durchführung der Verfahren.

Durch Bakterien verursachte Infektionen sind eine der häufigsten Ursachen für Entzündungskrankheiten. Zur Prognose des Krankheitsverlaufes sowie insbesondere zur rechtzeitigen Auswahl geeigneter therapeutischer Maßnahmen ist der frühzeitige Nachweis der bakteriellen Erreger von entscheidender Bedeutung.

Zum Nachweis bakterieller Erreger werden auch heute noch hauptsächlich verschiedene kulturabhängige Methoden angewendet. Eine Vielzahl von Nachteilen dieser Methoden führten dazu, daß gerade in der letzten Dekade parallel zur stürmischen technologischen Entwicklung der Molekularbiologie verstärkt nach Alternativen gesucht wurde. Erste Berichte zum Einsatz kulturunabhängiger Nachweisverfahren bakterieller Erreger, welche auf dem Prinzip der Polymerasekettenreaktion beruhen, stammen vom Anfang der 90er Jahre. So konnten beispielsweise Miller und Kollegen (Miller N J Clin Microbiol. 1994 Feb;32(2):393-7) zeigen, dass kulturunabhängige Verfahren den klassischen Kultivierungs- und Mikroskopietechniken beim Nachweis von *Mycobacterium tuberculosis* überlegen sind. In letzter Zeit haben aber weitere molekularbiologische Methoden, die auf dem Nachweis erregerspezifischer Nukleinsäuren basieren, an Bedeutung gewonnen (z.B. M. Grijalva et al. Heart 89. (2003) 263-268; Uyttendaele M et al. Lett Appl Microbiol. 2003;37(5):386-91; Saukkoriipi A et al. Mol Diagn. 2003 Mar;7(1):9-15; Tzanakaki G et al. FEMS Immunol Med Microbiol. 2003 Oct 24;39(1):31-6;).

Neben der hohen Spezifität solcher molekularbiologischer Methoden ist der geringe Zeitbedarf als wesentlicher Vorteil gegenüber konventionellen kulturabhängigen Methoden zu nennen. Allerdings ist die Sensitivität des Nachweises prokaryonten DNA direkt aus Körperflüssigkeiten und nicht vorbehandeltem Untersuchungsmaterial im Vergleich zur Kultur der Mikroorganismen bislang viel zu gering. Eine für den direkten Erregernachweis aus nicht vorbehandeltem Untersuchungsmaterial ausreichende Menge an Nukleinsäuren von Bakterien wird allenfalls im Bereich der 16S-rRNA-Analyse mittels PCR der 16S Region auf dem bakteriellen Chromosom und der anschließenden Sequenzanalyse des PCR Fragments erreicht, da sich meist mehrere Kopien für den die 16S-rRNA kodierenden Abschnitt auf dem Chromosom befinden. Der direkte spezifische Erregernachweis mittels 16S-rRNA-Analyse setzt voraus, dass sich nur eine Erreger-Spezies in der zu untersuchenden Probe befindet. Befinden sich verschiedene Erreger-Spezies in der Probe, ist ein spezifischer Nachweis über Sequenzierung der 16S-rRNA-Region nicht möglich, da die verwendeten Primer universell für die meisten Bakterien sind. Ferner müssen sich die nachzuweisenden Bakterien in der metabolischen Phase befinden und genügend 16S-rRNA exprimieren.

Davon ist insbesondere bei Patienten, die unter einer kalkulierten antibiotischen Therapie stehen, in der Regel nicht auszugehen. Darüber hinaus kommen bestimmte Pathogenitätsfaktoren von Bakterien nicht zu jeder Zeit zur Expression, obwohl die entsprechenden Gene im bakteriellen Genom vorhanden sind. Im Ergebnis werden dem klinisch tätigen Arzt falsch negative Befunde übermittelt. Dadurch kann eine gezielte antibiotische Therapie entweder gar nicht oder viel zu spät eingeleitet werden. Der Arzt ist in solchen Fällen auf sein Erfahrungswissen und auf allgemeine Richtlinien (wie z.B. der Paul-Ehrlich-Gesellschaft) angewiesen und wird daher viel zu allgemein antibiotisch behandeln. Der nicht zielgenaue Einsatz von Antibiotika birgt eine Reihe von Risiken nicht nur für den einzelnen Patienten (wie z.B. unnötige Nebenwirkungen in Form von Nierenschäden etc.), sondern auch für die gesamte Gesellschaft (z.B. die Entwicklung zusätzlicher Antibiotikaresistenzen wie MRSA (multiresistente *Staphylococcus aureus*, etc.)). Deshalb bietet der Nachweis der klinisch bedeutsamen Pathogenitätsfaktoren und Resistenzen von Bakterien auf chromosomaler und Plasmid-Ebene, also letztendlich auf DNA-Ebene, für die Diagnose vieler Infektionserkrankungen, aber auch der Sepsis, erhebliche Vorteile. Dies gilt umso mehr, da auf dieser Ebene auch eine Unterscheidung zwischen pathogenen und kommensalen Bakterien getroffen werden kann.

Am häufigsten erfolgt der erregerspezifische Nukleinsäurenachweis durch Nukleinsäure-Amplifikationstechniken (NAT), wie beispielsweise die Vervielfältigung der prokaryonten DNA mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) bzw. der Ligase-Kettenreaktion (LCR). Der hohen

Spezifität und schnellen Verfügbarkeit der Ergebnisse stehen die Störanfälligkeit durch Kontaminationen oder durch stark inhibierende Faktoren in klinischen Proben gegenüber.

5 Bei einem herkömmlichen PCR-Nachweisverfahren muß für eine erfolgreiche Detektion von Erregern im Blut mindestens 1 Target-DNA des Erregers in 10 µl Blut vorhanden sein. Das entspricht ca. 100 Targets in 1 ml Blut bzw. 1000 Targets in 10 ml Blut.

Anders verhält es sich mit der Blutkultur zum Nachweis von Erregern einer Infektion. Hier liegt die untere Nachweisgrenze bei etwa 3-5 Bakterien pro 10 ml.

10

Diese Nachweisgrenze wird derzeit mit PCR-Verfahren noch nicht erreicht, auch nicht mit solchen die ihre Zielsequenz im Bereich der 16S-rRNA Region auf dem Chromosom haben. Obwohl mehrere die 16S-rRNA kodierende Regionen auf dem bakteriellen Chromosom lokalisiert sind, meist 3 bis 6, bleibt die Voraussetzung, daß sich mindestens ein Molekül der Template-DNA im PCR-Reaktionsgemisch befindet. Eine verbesserte diagnostische Sicherheit ist von PCR-Verfahren zu erwarten, deren spezifische Zielsequenzen für speziesspezifische Proteine kodieren, entweder im Chromosom oder auf Plasmiden der Mikroorganismen. Auch hier trifft das Obengesagte zur Nachweisgrenze zu. Gerade unter dem Einfluß einer laufenden Antibiotikatherapie kann das Wachstum der Erreger stark verlangsamt oder eingeschränkt sein, auch wenn das eingesetzte Antibiotikum letztlich nicht wirksam ist. Diese Situation ist gerade bei solchen Patienten häufig anzutreffen, die bereits unter Antibiotikatherapie stehen und bei denen aus diesem Grund keine krankheitsverursachenden Bakterien aus den Blutkulturen oder anderen Proben (wie z.B. Trachealabstrichen, bronchoalveolären Lavagen (BAL) etc.) angezüchtet werden können.

25

Wegen unzureichender Sensitivität hat der erregerspezifische Nukleinsäurenachweis ohne Amplifikationsschritt durch direkten Nachweis der prokaryonten DNA (Sondentechnik, FISH-Technik) nur bei ausreichend hoher Keimzahl im Untersuchungsmaterial diagnostische Bedeutung.

30

Die wesentliche Problematik des Nachweises prokaryonten DNA zur Identifikation bakterieller Erreger in Körperflüssigkeiten bestehen neben PCR-hemmenden Bestandteilen im Untersuchungsmaterial vor allem im Überschuß von eukaryonten gegenüber prokaryonten DNA. Hierbei sind insbesondere kompetitive Prozesse bei der DNA-Analyse sowie die geringe Menge an prokaryonten DNA als hinderlich für einen qualitativen und quantitativen Erregernachweis anzusehen.

35

Die üblichen Methoden zur DNA-Isolierung reichern die Gesamt-DNA einer Körperflüssigkeit an, so daß das Verhältnis Wirts-DNA zu mikrobieller DNA zwischen $1:10^{-6}$ und $1:10^{-8}$ betragen kann. Aus diesem Unterschied ist die Schwierigkeit des Nachweises mikrobieller DNA in Körperflüssigkeiten gut nachzuvollziehen.

5

Es wäre also wünschenswert, die prokaryonte DNA von eukaryonter DNA trennen und insbesondere gegenüber letzterer auch anreichern zu können.

10

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, Mittel und Verfahren bereitzustellen, die die Trennung und/oder Anreicherung prokaryonter DNA aus Untersuchungsproben mit hohem Anteil eukaryonter DNA, insbesondere von Patienten mit Infektionen, ermöglicht.

15

Erfindungsgemäß wird dies durch ein Protein erreicht, das nicht methylierte CpG-Motive bindet, wobei es eine 25%ige bis 35%ige, insbesondere etwa 27,6%ige, Homologie zum Wildtyp-CGPB-Protein aufweist, wobei die Bindungsstelle für nicht methylierte CpG-Motive im erfindungsgemäßen Protein enthalten ist, und es gegenüber dem Wildtyp-Protein verkürzt ist, vorzugsweise bis maximal zur Länge der Bindungsstelle für nicht methylierte CpG-Motive. Dies bedeutet, daß es nur maximal soweit verkürzt ist, daß die Bindungsstelle für nicht methyliert

20

CpG-Motive erhalten bleibt.

25

Als Wildtyp-CGPB-Protein (oder CPGbP656) wird im folgenden das humane CGPB-Protein (vgl. Voo et al., Mol Cell Biol. 2000 Mar; 20(6): 2108-21.) bezeichnet. Das erfindungsgemäße Protein wird im folgenden als CPGbP181 bezeichnet. Das in EP 02020904 beschriebene Protein, das eine verkürzte Variante des Wildtyp-CGPB-Proteins ist und als Grundlage für das erfindungsgemäße Protein diente, wird im folgenden mit CPGbP241 bezeichnet.

Die Erfindung wird nachfolgend unter Bezugnahme auf die Figuren beschrieben, wobei

30

Figur 1 die Aminosäuresequenz von CPGbP181 (fett dargestellt) verglichen mit dem Wildtyp-CGPB-Protein (CPGbP656) und dem CPGbP241 (kursiv dargestellt) zeigt;

35

Figur 2 die DNA-Sequenz und Übersetzung in die Aminosäuresequenz des kompletten CPG-bindenden Proteins CPGbP656 zeigt, wobei die verkürzten CPG-bindenden Peptide CPGbP241 (fett) und CPGbP181 (kursiv) dargestellt sind;

Figur 3

eine PCR von Streptokokken-DNA in Humanblut darstellt;

Figur 4 eine nested PCR mit den PCR-Produkten aus dem Primär-PCR-Ansatz von Figur 3 als Template zeigt;

5 Figur 5 ein Gelretardierungsexperiment darstellt;

Figur 6 ein weiteres Gelretardierungsexperiment wiedergibt;

10 Figur 7 die Elution von Kalbsthymus-DNA und pUC18emm an rCpG-181-Sepharose zeigt, und

Figur 8 die Darstellung der Bestimmung der eluierten DNA in den Fraktionen durch Messung der Extinktion bei 254 nm in Abhängigkeit des NaCl-Gradienten ist.

15

Das Wildtyp-CGPB-Protein CPGBp656 bindet nicht methylierte CpG-Motive prokaryonter DNA, wobei ein Protein-DNA-Komplex gebildet wird. Dieser kann z.B. auf einem Träger gebunden sein oder werden, wodurch eine Trennung und/oder Anreicherung der DNA erfolgen kann. Die vorliegende Erfindung basiert nun auf der überraschenden Erkenntnis, das ein im Vergleich zum Wildtyp-CGPB-Protein (CPGBp656 mit 656 Aminosäuren) erfindungsgemäßes Protein, insbesondere CPGBp181 mit 181 Aminosäuren, das eine 27,6%ige Homologie zum Wildtyp-CGPB-Protein aufweist, eine verbesserte Bindungseigenschaft gegenüber nicht methylierten CpG-Motiven prokaryonter DNA als das Wildtyp-CGPB-Protein und Varianten davon mit 80% oder mehr Homologie besitzt.

25

Prokaryonte DNA unterscheidet sich von eukaryonter DNA beispielsweise durch das Vorkommen nicht methylierter CpG-Motive (Deutsches Ärzteblatt, Jg. 98/15: A981-A985 (2001)). Die Erfindung basiert auf der Kenntnis, daß sich eukaryonte DNA und prokaryonte DNA durch ihren Anteil an CpG-Motiven unterscheiden. In der prokaryonten DNA befinden sich CpG-Motive in einem 20-fachen Überschuß im Vergleich zu eukaryonter DNA, die solche Motive nur übergangsweise enthält, z.B. in Krebszellen oder Promotorregionen ((Deutsches Ärzteblatt, Jg. 98/15: A981-A985 (2001)). In prokaryonter DNA sind diese Motive nicht methyliert, wohingegen sie in eukaryonter DNA zum größten Teil methyliert sind, was die Unterschiedlichkeit nochmals erhöht. Nicht methylierte CpG-Motive sind nicht methylierte Deoxycytidylat-Deoxyguanylat-Dinucleotide innerhalb des prokaryonten Genoms oder innerhalb von Fragmenten desselben.

35

Des weiteren basiert die Erfindung auf der Kenntnis, daß das erfindungsgemäße Protein spezifisch an nicht methylierte CpG-Motive bindet. Diese spezifische Bindungseigenschaft des erfindungsgemäßen Proteins wird genutzt, um prokaryonte DNA zu binden und dadurch nachfolgend aus einer Probe z.B. mit überwiegendem Anteil eukaryonter DNA anzureichern, zu trennen und zu isolieren.

Der Begriff „Homologie“ im Sinne der vorliegenden Erfindung bezeichnet den Grad der Übereinstimmung von zwei Protein-Sequenzen. Dabei bedeutet x%ige Homologie, daß x von 100 Aminosäure-Positionen in den Sequenzen übereinstimmen. Der Ausdruck „verkürzt“ wie er zur Charakterisierung des erfindungsgemäßen Proteins verwendet wird, bedeutet, daß die Länge der Aminosäuresequenz des erfindungsgemäßen Proteins (CPGbP181) kürzer als die Länge der Aminosäuresequenz des Wildtyp-CGPB-Proteins (CPGbP656) ist. Die Verkürzung erfolgt am N-terminalen und am C-terminalen Ende der Wildtyp-Proteinsequenz (Figur 1). Die größte Verkürzung stellt dabei die DNA-Bindestelle des Proteins dar. Dies bedeutet, daß das erfindungsgemäße Protein gegenüber dem Wildtyp-Protein auf maximal die DNA-Bindungsstelle verkürzt ist.

Das erfindungsgemäße Protein kann vorzugsweise ein Molekulargewicht von etwa 19959 Dalton (nativ) bzw. 21444 Dalton (im Plasmid pQE60) aufweisen. In einer anderen bevorzugten Ausführungsform beträgt der isoelektrische Punkt des erfindungsgemäßen Proteins etwa 10,09 (natives Protein) bzw. 10,15 (im Plasmid pQE60). Ein besonders bevorzugtes erfindungsgemäßes Protein besitzt die in SEQ ID No. 2 bzw. Fig. 1 dargestellte Aminosäuresequenz. Dieses hat besonders gute Bindungseigenschaften gegenüber nicht methylierten CpG-Motiven prokaryonter DNA.

Das in EP 02020904 beschriebene Protein (CPGbP241), das eine verkürzte Variante des Wildtyp-CGPB-Proteins (CPGbP656) ist und als Grundlage für das erfindungsgemäße Protein (CPGbP181) diente, hat eine Länge von 241 Aminosäuren, ein Molekulargewicht von etwa 33650 Dalton (nativ) bzw. 28138 Dalton (im Plasmid pQE60) und einen isoelektrischen Punkt von 9,89 (nativ) bzw. 9,88 (im Plasmid pQE60). Die cDNA- und Aminosäuresequenz ist in Fig. 1 und 2 gezeigt.

Das Wildtyp-CGPB-Protein hat eine Länge von 656 Aminosäuren, 135 positiv und 94 negativ geladene Reste, ein Molekulargewicht von etwa 75684 Dalton und einen isoelektrischen Punkt von 8,15. Die cDNA- und Aminosäuresequenz ist in Fig.1 gezeigt.

Der Sequenzvergleich des erfindungsgemäßen Proteins (CPGbP181) gemäß SEQ ID No. 2 mit dem in EP 02020904 beschriebenen Protein (CPGbP241) ist in Fig. 1 und 2 dargestellt.

Das erfindungsgemäße Protein wird bevorzugt durch Klonierung der entsprechenden cDNA-Sequenz in ein Plasmid und Expression in *Escherichia coli* hergestellt. Ein das erfindungsgemäße Protein exprimierender *E.coli*-Stamm wurde am 16. Februar 2004 unter der
5 Nr. DSM 16229 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen hinterlegt. Alternativ können andere, dem Fachmann vertraute Verfahren zur Herstellung angewendet werden. Die Nutzung des Plasmids pQE9 stellt dabei eine beispielhafte Möglichkeit dar, aber jedes andere geeignete Plasmid ist als Vektor einsetzbar. Die Expression in *E. coli* stellt
10 ebenfalls nur ein Beispiel dar. Eine Expression in anderen prokaryonten System als auch in einem eukaryonten System als auch die chemische oder enzymatische Synthese oder die Aufreinigung aus einer genetisch veränderter Tabakpflanze sind weitere mögliche Ausführungsformen der Proteingewinnung. Das Protein kann sowohl im Labormaßstab (z.B. im Erlenmeyerkolben) als auch im industriellen Maßstab (z.B. Fermenter) hergestellt werden. Das
15 erfindungsgemäße Protein kann z.B. mittels Bindung von an den Anfang oder das Ende des Proteins eingebrachten Histidin-Reste (His-tag) an eine geeignete nickelhaltige Matrix gereinigt werden, eine Methode, die dem Fachmann bekannt ist.

Weitere Möglichkeiten der Reinigung können jegliche Art von Fusionsproteinen sein, die eine Aufreinigung über geeignete Matrices (Säulen, Gele, Beads etc.) erlauben. Andere Formen von
20 tag's können Fusionspeptide / -proteine, z.B. Streptavidin-tag, Myc-tag und andere sein.

Eine bevorzugte Form des erfindungsgemäßen Proteins ist die native Form, aber auch eine denaturierte Form ist zur Bindung nicht methylierter CpG-Motive geeignet. Unter „denaturierten
25 Formen“ im Sinne der vorliegenden Erfindung werden andere Sekundärstrukturen als die in der Natur vorkommenden verstanden.

Die native oder auch denaturierte Form des erfindungsgemäßen Proteins stellt eine beispielhafte Ausführungsform dar. Die Erfindung schließt die *in vitro*-Synthese sowie alle
30 weiteren chemischen oder enzymatischen Modifikation des Proteins ein, wie z.B. Einbau von Disulfidbrücken, Glykosylierungen, Phosphorylierungen, Acylierungen, Aminosäureaustausche sowie Fusion mit Proteinen oder anderen Molekülen ein. Solche Modifikationen können z.B. durch Rekombination und/oder Expression und/oder chemische und/oder enzymatische Modifikation einzelner oder mehrerer Aminosäuren erzielt werden.

Das erfindungsgemäße Protein weist eine Vielzahl von Vorteilen auf. Es kann, besser als das
35 Wildtyp-CGPB-Protein oder Varianten davon mit 80% oder mehr Homologie, prokaryonte DNA über nicht methylierte CpG-Motive binden. Dadurch wird es möglich, aus einem Gemisch von prokaryonter und eukaryonter DNA die prokaryonte DNA spezifisch abzutrennen und/oder

anzureichern. Dies ermöglicht letztendlich einen schnellen und einfachen Erregernachweis sowie eine frühzeitige Diagnose von Infektionen, die durch bakterielle Erreger verursacht sein können. Vice versa kann die Erfindung auch zur Abreicherung mikrobieller DNA im Sinne einer Reinigung bei klinischen Zuständen angewandt werden, die mit einem unphysiologischen Vorkommen von Bakterien oder deren Spaltprodukten Körperflüssigkeiten, insbesondere Blut, von Patienten einhergehen. Dies gilt umso mehr, da gut belegt ist, daß Bakterien aber auch deren Spaltprodukte, wie beispielsweise bakterielle DNA, für eine Vielzahl den Patienten schädigenden biologischen Effekte verantwortlich sind.

10 Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind ferner Antikörper, die gegen erfindungsgemäße Proteine gerichtet sind. Dabei kann es sich um mono- oder polyklonale Antikörper handeln. Sie können in an sich bekannter Weise hergestellt werden, wozu der Fachmann die notwendigen Materialien und Methoden kennt.

15 Die Antikörper können zur Isolierung und Quantifizierung der erfindungsgemäßen Proteine verwendet werden. Auch hierbei handelt es sich um an sich bekannte Einsatzmöglichkeiten, für die der Fachmann die notwendigen Materialien und Methoden kennt.

20 Gegenstand der Erfindung ist ferner Nukleinsäure, insbesondere DNA, die für ein erfindungsgemäßes Protein kodiert. Eine solche DNA ist die in SEQ ID No. 1 (oder Figur 2) dargestellte.

Aufgrund der guten Bindungsfähigkeit des erfindungsgemäßen Proteins an nicht methylierte CpG-Motive prokaryonten DNA ist weiterhin Gegenstand der Erfindung ein Verfahren zur Trennung und/oder Anreicherung prokaryonten DNA mit den Schritten

- 25
- a) Kontaktieren mindestens einer in Lösung befindlichen prokaryonten DNA mit dem erfindungsgemäßen Protein, wodurch ein Protein-DNA-Komplex gebildet wird, und
 - b) Separation des Komplexes.

30 Diese kann aufgereinigt und wieder in Lösung gebracht sein oder direkt in der Ursprungsquelle (z. B. Körperflüssigkeit, wie Blut, Serum, Trachealaspirat, Urin, bronchaleveoläre Lavage, Nasenabstrich, Hautabstrich, Punktionsflüssigkeit) vorliegen.

35 Die Separation kann mittels verschiedener Verfahren zur Trennung, Isolierung oder Anreicherung von DNA-Protein-Komplexen oder DNA-Polypeptid-Komplexe erfolgen, die dem Fachmann hinlänglich bekannt sind. Dabei werden bevorzugt Methoden angewendet, bei denen

das DNA-bindende Protein an einen Träger immobilisiert ist oder wird, um die DNA aus der Probelösung zu trennen und/oder anzureichern.

5 Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform schließt sich an die Separation ein Schritt zur Abtrennung der DNA vom erfindungsgemäßen Protein aus dem Komplex an. Dies kann beispielsweise durch herkömmliche Verfahren zur DNA-Aufreinigung erfolgen, die dem Fachmann bekannt sind. Im einfachsten Falle beruht die Abtrennung auf der Änderung des pH-Wertes oder der Salzkonzentration (z. B. auf 1 M NaCl) des Mediums/Puffers oder der
10 Zufügung chaotroper Reagenzien, etc; also geeignete Parameter, die zur Auflösung des Protein-DNA-Komplexes führen. Solche Methoden sind dem Fachmann bekannt.

15 Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist das erfindungsgemäße Protein an einen Träger gebunden. Diese Ausführungsform stellt eine besonders einfache Möglichkeit der Anreicherung prokaryonten DNA dar, da die Separation aus der Lösung besonders einfach, beispielsweise durch physikalischer Entfernung (z.B. Abzentrifugation) des oder der beladenen Träger aus der Lösung, erfolgen kann.

20 Für die Lösung für die prokaryonte DNA kommt grundsätzlich jedes geeignete Lösungsmittel in Frage. Besonders zweckmäßig ist das Verfahren jedoch zur Anreicherung prokaryonten DNA aus Lösungen, die verschiedene biomolekulare Spezies, insbesondere verschieden Arten von DNA, enthalten. Die Erfindung betrifft vorzugsweise ein Verfahren zur Trennung und Anreicherung prokaryonten oder viraler DNA aus einem Gemisch von prokaryonten und eukaryonten DNA. Dabei wird beispielsweise die in Körperflüssigkeiten befindliche prokaryonte DNA durch spezifische Bindung an das erfindungsgemäße Protein von der eukaryonten DNA
25 getrennt und angereichert. Die so angereicherte prokaryonte DNA erleichtert den Nachweis prokaryonten Erreger mit Hilfe molekularbiologischer Methoden und kann zur Diagnose von Krankheiten, die durch pathogene Erreger verursacht werden, beitragen.

30 Insbesondere die Ausführungsform, bei der das erfindungsgemäße DNA-bindende Protein an die Oberfläche eines Trägers immobilisiert ist, eignet sich für eine Adsorption prokaryonten DNA aus Körperflüssigkeiten, vorzugsweise aus dem Blut. Dieser Ansatz bietet überdies die Möglichkeit, mikrobielle DNA, die im Blut oder anderen Körperflüssigkeiten vorliegt, aus diesen zu entfernen. Die so von der mikrobiellen DNA, die auch allein in der Lage ist, schwere Entzündungsreaktionen bei Patienten auszulösen, gereinigte Körperflüssigkeit (z. B. Vollblut,
35 Serum oder Liquor), kann dann in den Körper zurückgeführt werden. Dieses Prinzip kann also zur Abreicherung prokaryonten DNA aus physiologischen Flüssigkeiten im Sinne der Reinigung eingesetzt werden, wobei die speziellen Bindungseigenschaften des erfindungsgemäßen Proteins genutzt werden.

Als Körperflüssigkeiten im Sinne der Erfindung werden alle vom Körper eines Säugers, einschließlich Mensch, stammenden Flüssigkeiten verstanden, insbesondere solche in denen Krankheitserreger vorkommen können, wie z. B. Blut, Urin, Liquor, Pleural-, Perikardial-, Peritoneal- sowie Synovialflüssigkeit. Die auf humanes Blut bezogene Beschreibung der Erfindung stellt keine Einschränkung sondern nur eine beispielhafte Anwendung dar.

Unter bakteriellen Erregern werden vorzugsweise Erreger einer Sepsis, aber auch alle anderen bakteriellen Erreger von Infektionen verstanden. Sie können sich dabei von kommensalen Erregern unterscheiden, die zur normalen Besiedlung des Organismus gerechnet werden und gelegentlich auch in Untersuchungsproben von Patienten gefunden werden, aber keine klinische Bedeutung haben.

Bei der Isolierung der Gesamt-DNA aus infizierten Körperflüssigkeiten kann das Verhältnis Wirts-DNA zur Erreger-DNA oft nur $1:10^{-6}$ bis $1:10^{-8}$ oder sogar noch weniger betragen. Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht durch die spezifische Bindung prokaryonter DNA an das erfindungsgemäße Protein eine Anreicherung um 1 Potenzeinheit und mehr.

Das erfindungsgemäße Protein kann direkt oder indirekt an den Träger gekoppelt sein. Die Art der Kopplung hängt von dem Träger und dem Trägermaterial ab. Als Träger kommen dabei insbesondere Membranen, Mikropartikel und Harze oder ähnliche Materialien für Affinitätsmatrices in Frage. Geeignete Materialien zur Anbindung des erfindungsgemäßen Proteins, sowie – abhängig von der Art des Materials – die Durchführung der Anbindung, sind dem Fachmann hinlänglich bekannt. Für die indirekte Kopplung eignen sich beispielsweise spezifische Antikörper gegen das erfindungsgemäße Protein oder das Polypeptid, die ihrerseits durch bekannte Verfahren an den Träger gebunden sind.

Eine Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht in der Anreicherung prokaryonter DNA. Eine weitere Anwendung besteht in der Trennung von prokaryonter DNA aus einem Gemisch eukaryonter und prokaryonter DNA durch die Bindung der prokaryonten DNA an das erfindungsgemäße Protein, welches z.B. an eine Matrix immobilisiert wurde. Das Gemisch aus körpereigener und prokaryonter DNA wird mittels geeigneter Verfahren mit der Affinitätsmatrix in Verbindung gebracht, und dabei wird die prokaryonte DNA an das immobilisierte erfindungsgemäße Protein gebunden; die eukaryonte DNA durchläuft zum Beispiel eine Trennsäule und kann separat gesammelt werden. Affinitätsmatrices können beispielsweise polymere Polysaccharide, wie Agarosen, andere Biopolymere, synthetische Polymere, oder Träger mit Silikat-Grundgerüst, wie poröse Gläser oder sonstige feste oder flexible Träger, sein, an welchen das erfindungsgemäße DNA-bindende Protein immobilisiert wird. Nach erfolgter

Trennung prokaryonter von eukaryonter DNA wird die Affinitätsmatrix mit einem geeigneten Reagenz gespült, so daß entweder das Bindungsprotein mit der gekoppelten prokaryonten DNA von der Matrix und/oder die prokaryonte DNA von dem Bindungsprotein getrennt wird und für weitere Arbeitsschritte in ausreichender Menge zur Verfügung steht.

5

Eine weitere Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht in der Trennung und Anreicherung prokaryonter DNA von eukaryonter DNA durch Bindung der prokaryonten DNA an das erfindungsgemäße Protein welches an Mikropartikeln immobilisiert wurde. Hierbei kommen alle Mikropartikel in Frage, die eine Immobilisierung des DNA-bindenden erfindungsgemäßen Proteins ermöglichen. Solche Mikropartikel können aus Latex, Kunststoff (z. B. Styropor, Polymer), Metall oder ferromagnetischen Stoffen bestehen. Weiterhin können auch fluoreszierende Mikropartikel, wie sie beispielsweise von der Firma Luminex angeboten werden, verwendet werden. Nachdem die prokaryonte DNA an die an Mikropartikel immobilisierten erfindungsgemäßen Proteine gebunden wurde, werden die Mikropartikel mit geeigneten Methoden, wie beispielsweise Filtration, Zentrifugation, Fällung, Sortierung über Messung der Fluoreszenzintensität oder magnetische Verfahren, von dem Stoffgemisch getrennt. Die prokaryonte DNA steht nach Trennung von den Mikropartikeln zur weiteren Verarbeitung zur Verfügung.

10

15

20 Eine andere Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht in der Trennung und Anreicherung prokaryonter DNA von eukaryonter DNA durch Bindung der prokaryonten DNA an das erfindungsgemäße Protein, welches anschließend durch Elektrophorese von übrigen Bestandteilen des Gemisches getrennt wird.

25

Eine weitere Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht in der Trennung und Anreicherung prokaryonter DNA von eukaryonter DNA durch Bindung der prokaryonten DNA an das erfindungsgemäße Protein, wobei das erfindungsgemäße Protein anschließend an entsprechende Antikörper gebunden wird. Die Antikörper können an feste oder flexible Substrate, z. B. Glas, Kunststoffe, Silizium, Mikropartikel, Membranen gebunden sein, oder sich in Lösung befinden. Nach Bindung der prokaryonten DNA an das erfindungsgemäße Protein und dessen Bindung an den spezifischen Antikörper erfolgt die Trennung aus dem Stoffgemisch mit dem Fachmann bekannten Methoden.

30

Das erfindungsgemäße Verfahren kann auch zur Reinigung von Körperflüssigkeiten von prokaryonter DNA eingesetzt werden. Hierbei ist es zweckmäßig, daß die Separation extrakorporal unter sterilen Bedingungen erfolgt, damit die Körperflüssigkeiten wieder in den Körper zurückgeführt werden können, so daß das körpereigene Immunsystem bei der

35

Beseitigung von Infektionen unterstützt wird, indem die sich in den Körperflüssigkeiten befindende prokaryonte DNA entfernt wird.

5 Bei der extrakorporalen Entfernung der prokaryonten DNA aus Körperflüssigkeiten kommen alle geeigneten chemischen, mechanischen oder elektrochemischen Verfahren in Betracht. Weiterhin stellt auch die Kombination mit anderen extrakorporalen Verfahren, wie Hämo-perfusion, Herz-Lungen-Maschine oder Endotoxin-Adsorber, eine weitere zweckmäßige Anwendung dar.

10 Das erfindungsgemäße Protein kann auch zur Detektion prokaryonter DNA eingesetzt werden. Hierbei schließt sich nach der Anreicherung der prokaryonten DNA ein Schritt zur Amplifikation der prokaryonten DNA an, wozu sich alle gängigen Amplifikationsmethoden eignen (PCR, LCR, LM-PCR etc.).

15 Die Erfindung betrifft darüber hinaus einen Kit zur Anreicherung prokaryonter DNA mittels eines der vorstehend beschriebenen Verfahren, in dem zumindest das erfindungsgemäße Protein gegebenenfalls zusammen mit weiteren geeigneten Reagenzien zur Verfahrensdurchführung enthalten sind.

20 Der Kit kann neben dem erfindungsgemäßen Protein mindestens ein Set von Primern, welche zur Amplifikation genomischer DNA bestimmter Prokaryonten unter Standardbedingungen geeignet sind, enthalten.

25 Das erfindungsgemäße Verfahren, insbesondere mit den vorstehend beschriebenen Ausführungsformen hat den Vorteil, daß durch spezifische Bindung nicht-methylierter CpG-motiv-reicher prokaryonter DNA an Proteine mit spezifischer Affinität für solche Strukturen eine Konzentrierung prokaryonter DNA aus der Gesamt-DNA eines infizierten Wirts gelingt und damit die Nachweisempfindlichkeit für Verfahren zum Nachweis von Erreger-DNA in Körperflüssigkeiten stark erhöht wird.

30 Die Abtrennungsmöglichkeiten prokaryonter DNA von eukaryonter DNA mit einem spezifisch bindenden Protein sind nicht zeitaufwendiger als bekannte Methoden zur Isolierung von Gesamt-DNA. Der nachfolgende DNA-Nachweis kann über eine PCR-Reaktion erfolgen. Eine nested PCR wird in den meisten Fällen nicht notwendig sein, so daß eine beträchtliche
35 Zeitersparnis in der Diagnostik möglich wird.

Bereits vorstehend wurde angesprochen, das erfindungsgemäße Protein zur Abreicherung prokaryontischer DNA in physiologischen Körperflüssigkeiten einzusetzen. Abreicherung im

Sinne der vorliegenden Erfindung bedeutet dabei, daß die Menge der prokaryontischen DNA verringert wird. Diese Möglichkeit zur Verringerung der prokaryontischen DNA ermöglicht es auch, die erfindungsgemäßen Proteine in der Umwelttechnik, der Abwasserwirtschaft und der Klimatechnik einzusetzen.

5

Die Erfindung wird nachfolgend anhand der Beispiele erläutert, ohne sie aber darauf einzuschränken.

Beispiel 1: Herstellung des erfindungsgemäßen Proteins

10

Aus der DNA Sequenz für das komplette CPGbP Protein wurden die Primer 1 (GGATCCGGTGGAGGGCGCAAGAGGCCTG -fw, SEQ ID Nr. 3) und 2 (AAGCTTAGAGGTAGGTCCTCAT-CTGAG-rv, SEQ ID Nr. 4) konstruiert, die ein verkürztes DNA-Fragment amplifizieren, das für ein verkürztes CPG-bindendes Protein, CPGbP181, kodiert. Das DNA-Fragment wurde nach Spaltung mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Hind* III in den Vektor pQE9 (Qiagen) ligiert. In pQE9 entsteht ein offener Leserahmen, in dem an das 5' Ende ein für 6 x His-Tag kodierendes DNA Fragment fusioniert wird (pQE9[6HisCPGbP181]).

15

20

Das Plasmid pQE9[6HisCPGbP181] wurde in den *E. coli* Expressionsstamm M15[pREP4] (Qiagen) transformiert. Der Klon wird im weiteren M15[pCPGbP181] bezeichnet und das exprimierte Protein rCPGbP181. Die Expression des Proteins rCPGbP181 erfolgte nach folgendem Protokoll: Eine Kolonie des Expressionsstammes M15[pCPGbP181] wird in 2 ml Luria Medium mit 100µg/ml Ampicillin und 25µg/ml Kanamycin bei 37°C unter Schütteln über Nacht angezüchtet. Anschließend wird die Vorkultur in 200 ml vorgewärmtes Nährmedium, das die gleichen Antibiotikakonzentrationen enthält, überführt. Nach 3 Stunden Wachstum bei 37°C unter Schütteln wird IPTG zur Induktion der Expression zugegeben und weitere 5 Stunden inkubiert. Danach werden die Bakterien abzentrifugiert und das Sediment in 5 ml 0.2 M Trispuffer, pH 7.5 resuspendiert. Die Bakterien werden im Eisbad 5 x 1 min mit Ultraschall behandelt. Nach der Zentrifugation wird das Sediment in 10 ml 0.2 M Tris, 2M Harnstoff, pH7.5 resuspendiert und 15 min geschüttelt. Nach erfolgter Zentrifugation wird das verbliebene Sediment in 0.2 M Tris, 6M Guanidinhydrochlorid, 0.001 M Dithioeritrit (DTE), 0.02 M Imidazol aufgenommen und suspendiert. Die Inclusionbodies werden unter Agitation für 1 Stunde bei Raumtemperatur gelöst. Nach Zentrifugation befindet sich das Rohprotein im Überstand und kann direkt auf eine 3 ml Ni-Agarosesäule aufgetragen werden. Die nächsten Schritte sollten im Kühlraum bei +4 bis +6°C erfolgen. Zunächst wird die Säule mit 0.2 M Tris, 6M Guanidinhydrochlorid, 0.001 M Dithioeritrit (DTE), 0.02 M Imidazol Puffer, pH7.5 gewaschen bis die Extinktion die Nulllinie erreicht hat. Von hier aus kann rCPGbP181 auf verschiedenen

30

35

Wegen gewonnen werden: 1. Als denaturiertes Protein gelöst in 6M Guanidinhydrochlorid oder 6 M Harnstoff und 2. als natives Protein löslich in Puffern physiologischer Konzentration. Im 2. Fall ist die Ausbeute aber geringer.

5 Reinigung nach Methode 1 (denaturiert):

Das Protein rCPGbP181 wird von der Ni-NTA Agarose mit einem Imidazolgradienten von 0 – 0.5 M eluiert in dem Puffer 0.2 M Tris, 6M Guanidinhydrochlorid, 0.001 M Dithioeritrit (DTE), 0.02 M Imidazol, pH7.5 als Grundlage. Dabei wird rCPGbP181 bei 0.2 – 0.3 M Imidazol von der Säule abgelöst. Das so gewonnene Protein wird gegen 0.2 M Tris, 6M Harnstoff, 0.001 M Dithioeritrit (DTE), pH7.5 dialysiert und eingefroren. Bei Dialyse gegen physiologische Puffer fällt so gereinigtes rCPGbP181 aus.

Reinigung nach Methode 2 (nativ):

15 Nach dieser Methode wird die Guanidinhydrochlorid Konzentration von 6 molar auf der Ni-NTA Agarose mit dem gebundenem rCPGbP181 über einen Gradienten auf 0 molar Guanidinhydrochlorid gebracht. Grundlage ist der Puffer 0.2 M Tris, 0.5 M NaCl, 0.001 M Dithioeritrit (DTE), 0.02 M Imidazol, pH7.5. Die Flussgeschwindigkeit betrug 0.5 ml/min. Danach wurde zur Elution ein Imidazolgradient von 0 bis 0.5 molar angelegt in Puffer 0.2 M Tris, 0.5 M NaCl, 0.001 M Dithioeritrit (DTE), pH7.5 als Grundlage. Auch hier wurde ein wesentlicher Anteil des gebundenen Proteins (20%) bei 0.2 bis 0.3 molar Imidazol eluiert. Dieses native rCPGbP181-Eluat blieb in diesem Puffer gelöst, auch nach Dialyse in PBS. Von Nachteil ist aber, dass ca. 80% des an Ni-NTA Agarose gebundenen rCPGbP181 unter diesen Bedingungen auf der Säule verblieben und nachträglich nur unter den denaturierenden Bedingungen von Methode 1 noch gewonnen werden konnten. Das heißt, die Ausbeute der verwendeten Methode 2 ergab nur 20% natives, in physiologischen Puffern lösliches rCPGbP181.

Beispiel 2: Erregernachweis mittels nested PCR:

30

Frisches, heparinisiertes Humanblut, das *Streptococcus pyogenes* mit 10^3 /ml koloniebildende Einheiten als Erreger enthält, wird für den Erregernachweis verwendet. Die DNA wird mittels Absorption an DNA bindende Matrix mit kommerziellen Kits zur Isolierung von Gesamt-DNA aus Körperflüssigkeiten nach abgewandelter Vorschrift der Hersteller isoliert. Dazu werden 100 µl infiziertes Blut in Eppendorf Tubes mit 200 µl des Totallysispuffers versetzt, der Proteinase K und SDS enthält. Das Gemisch wird 30 min bei 37°C inkubiert, und danach 20 min auf 95°C erhitzt. Nach dem Abkühlen werden 20 µg Mutanolysin zugegeben und weitere 60 min bei 37°C inkubiert. Nach Zentrifugation wird das Gemisch auf die Zentrifugationssäulchen mit DNA-

35

bindender Matrix aufgetragen und die DNA nach Vorschrift des Herstellers gereinigt. Die gereinigte DNA wird in einem Endvolumen von 100 µl 0.01 molar Trispuffer, pH 7.5 oder in gleicher Menge Elutionpuffer des Herstellers aufgenommen. Für den Erregernachweis wurden Primer zur Identifizierung des Streptolysin O Gens (slo) konstruiert.

- 5 1. PCR. Amplifikation eines 465 bp Fragmentes
Forward-Primer 1: 5'-AGCATACAAGCAAATTTTTTACACCG (SEQ ID Nr. 5)
Reverse-Primer 2: 5'- GTTCTGTTATTGACACCCGCAATT (SEQ ID Nr. 6)
Primer Konzentration 1mg/ml
Ansatz: 5µl DNA-Isolat
10 0.5 µl Primer fw 1
0.5µl Primer rv 2
14µl Aqua dest
total 25 µl in Ready to go Kit (Amersham-Pharmacia)

- 15 Reaktion:
5 min 95 °C
Zyklen 40 (30 sec. 95°C, 30 sec 51° C, 3 min 72°C, 1 x 7min 72°C)

- 20 In Fig. 3 ist die 1. PCR von Streptokokken-DNA in Hummanblut dargestellt (je 10 µl des 25 µl Ansatzes aufgetrennt: 1)PCR Ansatz mit 5 µl Template DNA; 2) Ansatz mit 5µl Template, 1 : 10 verdünnt. 3) Positivkontrolle: 0.2 µl Streptokokken-DNA als Template ohne Anwesenheit eukaryotischer DNA aus Blut. ST) Molekulargewichtsstandard)

- 25 Ergebnis: Die 1. Primär-PCR ergibt keine positive Reaktion. Deshalb wurde nachfolgend eine 2. PCR (nested PCR) durchgeführt.
2: PCR, nested PCR. Amplifikation eines 348 bp Fragmentes innerhalb des obigen slo-Fragments

- 30 Forward Primer 3: 5'- CCTTCCTAATAATCCTGCGGATGT (SEQ ID Nr. 7)
Reverse Primer 4: 5'- CTGAAGGTAGCATTAG TCTTTGATAACG (SEQ ID Nr. 8)
Primer-Konzentration: 1mg/ml

- Ansatz: 5µl aus PCR1, Probe 1, Fig. 3
35 0.5 µl Primer fw 1
0.5µl Primer rv 2
14µl Aqua dest
total 25 µl in Ready to go Kit (Amersham-Pharmacia)

Reaktion:

5 min 95 °C

Zyklen 40 (30 sec. 95°C, 30 sec 54° C, 3 min 72°C, 1 x 7min 72°C)

5

In Fig. 4 ist die nested PCR mit den PCR-Produkten aus dem Primär-PCR-Ansatz in Fig 3 als Template gezeigt. Die Proben entsprechen denen aus Fig. 3.

10

Ergebnis: In der nested PCR wird das gewünschte slo-DNA Fragment amplifiziert bei einer Konzentration von 100 Streptokokkenzellen pro 100 µl Blut (Probe 1). Das entspricht bei 5µl Einsatz in der 1. PCR (Fig. 3) ca 5 bis 10 Templates. Bei einer 1:10 Verdünnung (Probe 2) ist die Empfindlichkeit erschöpft (0,5 bis 1 Template).

15

Aus diesen Versuchen ist ersichtlich, dass für einen erfolgreichen PCR-Nachweis von Erregern im Blut die Gesamt-DNA aus mindestens 1 bis 5 ml Blut isoliert werden muss. Die Gesamt-DNA-Konzentration ist dann aber zu groß, um direkt in einer PCR eingesetzt zu werden.

20

Andere erregerspezifische Nukleinsäurenachweise ohne Amplifikationsschritt durch direkte Detektion der bakteriellen DNA, z.B. mittels DNA-Hybridisierung, sind ebenfalls zu unempfindlich, was vor allem am hohen Überschuss von humaner DNA gegenüber bakterieller DNA liegt. Hierbei sind zudem kompetitive Prozesse bei der DNA-Analyse sowie die geringe Menge an bakterieller DNA als hinderlich für eine qualitative und quantitative Analyse anzusehen. Die üblichen Methoden zur DNA-Isolierung reichern die Gesamt-DNA einer Körperflüssigkeit an, sodass das Verhältnis Wirts-DNA zu mikrobieller DNA zwischen $1 : 10^{-6}$ und $1 : 10^{-8}$ betragen kann. Aus diesem Unterschied ist die Schwierigkeit des Nachweises mikrobieller DNA in Körperflüssigkeiten gut nachzuvollziehen.

25

Beispiel 3: Ermittlung der Bindungseigenschaften von rCPGbP181:

30

35

In Gelretardierungsexperimenten wurde sowohl die Bindung des denaturierten als auch die des nativen Proteins rCpGbP181 an methylierte und nicht-methylierte DNA-Moleküle mit CpG-Motiven untersucht. Als Test-DNA wurde das *E. coli* Plasmid pUC18 verwendet mit einem inserierten M-Proteingensegment von *Streptococcus dysgalactiae* supsp. *equisimilis* (Geyer et al. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 26:11-24, 1999). Die Plasmidpräparation wurde geteilt und die eine Hälfte mit dem CpG-Methylase-Kit von New England BioLabs methyliert. Beide Präparationen wurden mit rCPGbP181 (nativ oder denaturiert) gemischt und im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Ergebnisse sind in den Figuren 5 und 6 einzusehen. Sowohl

rCPGbP181 in nativer als auch in denaturierter Form zeigte höhere Affinität zur nichtmethylierten Plasmid-DNA, was die selektive Bindungseigenschaft für nichtmethylierte CpG-reiche DNA bestätigt.

5 Beschreibung des Gelretardierungsexperiment gemäß Figur 5: Je 5 μ l (72 ng) methylierte und 1 μ l (142 ng) nicht methylierte pUC18*emm* DNA wurden mit 5 μ l (0.5 μ g) nativem rCPGbP181 gemischt und auf ein Volumen von 35 μ l mit dem Puffer: 0.01M Tris, 0.08M NaCl, 0.001M EDTA, 0.005M DTE, 5% Glycerin, pH7.8 aufgefüllt. Nach 30 min Inkubation bei 20°C wurden
10 die Gemische elektrophoretisch in 1.5%iger Agarose aufgetrennt. In Lanes 1 und 3 wurde methylierte DNA und in Lanes 2 und 4 nichtmethylierte DNA aufgetragen. In Lanes 1 und 2 wurde die DNA mit nativem rCPGbP181 gemischt. Lane 2 zeigt, dass nichtmethyliertes pUC18*emm* mit rCPGbP181 interagiert, keine Wechselwirkung zeigte dagegen rCPGbP181 mit methyliertem pUC18*emm* (Lane1). Lanes 4 und 5 sind die Plasmide ohne Zusatz von rCPGbP181 als Kontrollen.

15 Beschreibung des Gelretardierungsexperiment aus Figur 6 von nicht methyliertem und methyliertem pUC18*emm* nach Inkubation mit denaturiertem rCPGbP181. Die Konzentrationen entsprechen denen von Fig 5. In Lanes 1 und 3 wurde methylierte DNA und in Lanes 2 und 4 nichtmethylierte DNA aufgetragen. In Lanes 1 bis 4 wurde die DNA mit zwei verschiedenen
20 Chargen von denaturiertem rCPGbP181 gemischt. Lanes 2 und 4 zeigen, dass nichtmethyliertes pUC18*emm* auch mit denaturiertem rCPGbP181 interagiert, keine Wechselwirkung zeigte dagegen rCPGbP181 mit methyliertem pUC18*emm* (Lanes 1 und 3). Lane 5 pUC18*emm* ohne rCPGbP181 als Kontrolle.

25 **Beispiel 4:** Bindung und Trennung eines Gemisches von Kalbsthymus-DNA und bakterieller DNA an immobilisiertes CPGbP181.

Gereinigtes CPGbP181 wurde mittels Glutaraldehyd an Aminoethyl-Sepharose (Amersham-Biosciences) nach der Vorschrift von Cambiasso et al. (Cambiasso, C. et al., Immunochimistry
30 12:273-278, 1975) gekoppelt. Die immobilisierte Proteinkonzentration betrug 0.3 mg pro Milliliter Sepharose. 300 μ l Sepharose wurden in ein Spin-Filter Röhrchen mit innertem Frittenmaterial gegeben, das weder DNA noch Protein absorbiert, jedoch die Sepharose zurückhält.

200 ng Kalbsthymus-DNA (eukaryontische DNA) und 25 ng pUC18*emm* (prokaryontische DNA)
35 wurden in 100 μ l 20 mM Tris-HCL Puffer, pH 7.5 gelöst und auf das so präparierte Säulchen gegeben. Nach jedem Schritt wurde die Flüssigkeit 0,5 min bei 14 000 Umdrehungen pro Minute in einer Eppendorffzentrifuge in je ein frischen Eppendorfröhrchen zentrifugiert. So wurde die NaCl-Konzentration in Stufen von 50 mM von 0 auf 1000 mM erhöht. In jedem Röhrchen

wurde eine DNA-Fällung durchgeführt indem 10 µl 4 M Acetat, pH4,5 und 250 µl abs. Ethanol zugegeben wurden, anschließend gemischt wurden und dann 15 min bei 14 000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert wurden. Danach wurde der Überstand abgegossen und das Präzipitat wurde mit 300 µl 70%igem Ethanol gewaschen. Nach Abgießen wurde der Rückstand 5 min in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und anschließend in 15 µl dest. Wasser (PCR-tauglich) aufgenommen. Zum einen wurde die Extinktion bei 254 nm von je 10 µl der Proben gemessen (Figur 7). Zum anderen wurde mit je 3 µl jeder Probe eine PCR mit Sequenzprimern für PUC18 durchgeführt (Figur 8).

- 10 Das Ergebnis (Figur 7,8) zeigt, daß die eukaryontische Kalbsthymus-DNA am Anfang zwischen 0 bis 0,1 M NaCl von der Säule gewaschen wird, während die prokaryontische DNA (pUC18*emm*) in der Fraktion bei 0.35 M NaCl eluiert wurde. Das zeigt, dass eukaryontische DNA eine niedrigere Affinität zu CPGbP181 aufweist und somit eine eindeutige Trennung beider DNA-Fractionen erreicht wurde.

SIRS-Lab GmbH
Anwaltsakte: PAT 3696/029

5. März 2004
H/18/kt

Patentansprüche

- 5 1. Protein, das nicht methylierte CpG-Motive bindet, wobei es eine 25%ige bis 35%ige Homologie zum Wildtyp-CGPB-Protein aufweist und gegenüber diesem verkürzt ist, wobei die Bindungsstelle für nicht methylierte CpG-Motive erhalten ist.
2. Protein nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei es die Aminosäure-Sequenz
10 gemäß SEQ ID No. 2 aufweist.
3. Protein nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei es durch Modifikation hergestellt ist.
- 15 4. Protein nach Anspruch 3, wobei die Modifikation durch Rekombination und/oder Expression und/oder chemische und/oder enzymatische Modifikation einzelner oder mehrerer Aminosäuren erzielt wird.
- 20 5. Protein nach Anspruch 4, wobei die Modifikation durch den Einbau von Disulfidbrücken, Glykosylierungen, Phosphorylierungen, Acylierungen, Aminosäureaustausche sowie Fusion mit weiteren Proteinen oder anderen Molekülen erreicht wird.
6. Protein nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei es bis maximal auf die Länge der Bindungsstelle verkürzt ist.
- 25 7. Antikörper gegen die gemäß den vorhergehenden Ansprüchen definierten Proteine, wobei die Antikörper monoklonale oder polyklonale Antikörper sind.
8. Verwendung der Antikörper nach Anspruch 7 zur Isolierung und Quantifizierung des
30 Proteins, wie es gemäß den Ansprüchen 1 bis 6 definiert ist.

9. Verfahren zur Trennung und/oder Anreicherung prokaryonter DNA mit den Schritten:

- a) Kontaktieren mindestens einer in Lösung befindlichen prokaryonten DNA mit dem Protein nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wodurch ein Protein-DNA-Komplex gebildet wird, und
- b) Separation des Komplexes.

10. Verfahren gemäß Anspruch 9, wobei sich an die Separation ein Schritt zur Abtrennung der DNA vom Protein aus dem Komplex anschließt.

11. Verfahren gemäß Anspruch 9 oder 10, wobei das Protein an einen Träger gebunden ist.

12. Verfahren gemäß Anspruch 11, wobei das Protein direkt an den Träger gebunden ist.

13. Verfahren gemäß Anspruch 11, wobei das Protein über einen dagegen gerichteten Antikörper an den Träger gebunden ist.

14. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 11 bis 13, wobei der Träger als Matrix, Mikropartikel oder Membran ausgebildet ist.

15. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 9 bis 14, wobei die Separation mittels eines gegen das Protein gerichteten Antikörper oder Antiserum erfolgt.

16. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 9 bis 14, wobei die Separation mittels Elektrophorese erfolgt.

17. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 12 bis 16, wobei das Protein ein gegen nicht-methylierte CpG-Motive gerichteter Antikörper oder ein entsprechendes Antiserum ist.

18. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 9 bis 17, wobei die Lösung ein Gemisch aus eukaryonter und prokaryonter DNA enthält.

19. Verfahren gemäß Anspruch 18, wobei die Lösung eine Körperflüssigkeit oder davon abgeleitet ist, insbesondere Vollblut, Serum, Plasma, Zellpräparationen aus Vollblut, Urin, Liquor, Pleural-, Perikardial-, Peritoneal-, Synovialflüssigkeit und bronchoalveoläre Lavage.

20. Verfahren nach einem der Ansprüche 17 bis 19, wobei die Separation mittels eines Filters erzielt wird, welcher entsprechende DNA-Protein-Komplexe herausfiltert.

21. Verfahren nach Anspruch 20, wobei das Protein auf einer Filtermatrix immobilisiert ist.

22. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 21 zur Anwendung in der Umwelttechnik, der Wasser- und Abwasserwirtschaft sowie der Klimatechnik.

23. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 21, wobei weiterhin nach Schritt b) als Schritt c) die prokaryonte DNA amplifiziert wird.

24. Verfahren nach Anspruch 23, mit den Schritten:

- a) Isolierung der prokaryonten DNA aus dem Protein DNA-Komplex,
- b) Denaturierung der doppelsträngige DNA,
- c) Hybridisierung der Einzelstränge der DNA mit komplementären Primern,
- d) Generierung von Doppelstrangfragmenten über Reaktion mit Polymerasen und
- e) Wiederholung dieser Schritte zum gewünschten Amplifikationsgrad.

25. Verfahren nach Anspruch 24, mit den Schritten:

- a) Klonierung der isolierten prokaryonten DNA-Sequenzen in Vektoren,
- b) Transformation geeigneter Wirtszellen mit diesen Vektoren,
- c) Kultivieren dieser transformierten Zellen,
- d) Isolation der Vektoren aus diesen Zellen und
- e) Isolierung der DNA.

26. Kit zur Anreicherung prokaryonter DNA mittels eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 9 bis 25.

27. Test-Kit zur Detektion prokaryonter DNA mittels eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 9 bis 25 mit einem oder mehreren Sets spezifischer Primer.

28. Verwendung der Proteine nach den Ansprüchen 1 bis 6 für das Screening von Substanzbibliotheken bezüglich ihrer Bindeeigenschaften an proteingebundene DNA-Sequenzen.

29. Nukleinsäure, kodierend für ein Protein nach einem der Ansprüche 1 bis 6.

SEQUENZPROTOKOLL

5 <110> SIRS-Lab GmbH
 <120> Protein mit verbesserten Bindungseigenschaften für
 prokaryonte DNA sowie Verfahren zur Trennung und
 Anreicherung prokaryonter DNA
 10 <130> Pat 3696/29
 <140>
 <141>
 15 <160> 8
 <170> PatentIn Ver. 2.1
 20 <210> 1
 <211> 543
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 25 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(561)
 <400> 1
 30 ggt gga ggg cgc aag agg cct gtc cct gat cca aac ctg cag cgc cgg 48
 Gly Gly Gly Arg Lys Arg Pro Val Pro Asp Pro Asn Leu Gln Arg Arg
 1 5 10 15
 gca ggg tca ggg aca ggg gtt ggg gcc atg ctt gct cgg ggc tct gct 96
 Ala Gly Ser Gly Thr Gly Val Gly Ala Met Leu Ala Arg Gly Ser Ala
 35 20 25 30
 tcg ccc cac aaa tcc tct ccg cag ccc ttg gtg gcc aca ccc agc cag 144
 Ser Pro His Lys Ser Ser Pro Gln Pro Leu Val Ala Thr Pro Ser Gln
 35 40 45
 40 cat cac cag cag cag cag cag cag atc aaa cgg tca gcc cgc atg tgt 192
 His His Gln Gln Gln Gln Gln Gln Ile Lys Arg Ser Ala Arg Met Cys
 50 55 60
 45 ggt gag tgt gag gca tgt cgg cgc act gag gac tgt ggt cac tgt gat 240
 Gly Glu Cys Glu Ala Cys Arg Arg Thr Glu Asp Cys Gly His Cys Asp
 65 70 75 80
 50 ttc tgt cgg gac atg aag aag ttc ggg ggc ccc aac aag atc cgg cag 288
 Phe Cys Arg Asp Met Lys Lys Phe Gly Gly Pro Asn Lys Ile Arg Gln
 85 90 95
 aag tgc cgg ctg cgc cag tgc cag ctg cgg gcc cgg gaa tcg tac aag 336
 Lys Cys Arg Leu Arg Gln Cys Gln Leu Arg Ala Arg Glu Ser Tyr Lys
 55 100 105 110
 tac ttc cct tcc tcg ctc tca cca gtg acg ccc tca gag tcc ctg cca 384
 Tyr Phe Pro Ser Ser Leu Ser Pro Val Thr Pro Ser Glu Ser Leu Pro

	115	120	125	
5	agg ccc cgc cgg cca ctg ccc acc caa cag cag cca cag cca tca cag Arg Pro Arg Arg Pro Leu Pro Thr Gln Gln Gln Pro Gln Pro Ser Gln 130 135 140			432
10	aag tta ggg cgc atc cgt gaa gat gag ggg gca gtg gcg tca tca aca Lys Leu Gly Arg Ile Arg Glu Asp Glu Gly Ala Val Ala Ser Ser Thr 145 150 155 160			480
15	gag gac cta cct ctg Glu Asp Leu Pro Leu 180			528
20				543
25				
30				
35				
40				
45				
50				
55				

<210> 2
 <211> 181
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 Gly Gly Gly Arg Lys Arg Pro Val Pro Asp Pro Asn Leu Gln Arg Arg
 1 5 10 15
 Ala Gly Ser Gly Thr Gly Val Gly Ala Met Leu Ala Arg Gly Ser Ala
 20 25 30
 Ser Pro His Lys Ser Ser Pro Gln Pro Leu Val Ala Thr Pro Ser Gln
 35 40 45
 His His Gln Gln Gln Gln Gln Gln Ile Lys Arg Ser Ala Arg Met Cys
 50 55 60
 Gly Glu Cys Glu Ala Cys Arg Arg Thr Glu Asp Cys Gly His Cys Asp
 65 70 75 80
 Phe Cys Arg Asp Met Lys Lys Phe Gly Gly Pro Asn Lys Ile Arg Gln
 85 90 95
 Lys Cys Arg Leu Arg Gln Cys Gln Leu Arg Ala Arg Glu Ser Tyr Lys
 100 105 110
 Tyr Phe Pro Ser Ser Leu Ser Pro Val Thr Pro Ser Glu Ser Leu Pro
 115 120 125
 Arg Pro Arg Arg Pro Leu Pro Thr Gln Gln Gln Pro Gln Pro Ser Gln
 130 135 140
 Lys Leu Gly Arg Ile Arg Glu Asp Glu Gly Ala Val Ala Ser Ser Thr
 145 150 155 160
 Val Lys Glu Pro Pro Glu Ala Thr Ala Thr Pro Glu Pro Leu Ser Asp
 165 170 175

Glu Asp Leu Pro Leu
180

5
 <210> 3
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

10
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

15
 <400> 3
 ggatccggtg gagggcgcaa gaggcctg 28

20
 <210> 4
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

25
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

27
 <400> 4
 aagcttagag gtaggtcctc atctgag

30
 <210> 5
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

35
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

40
 <400> 5
 agcatacaag caaatttttt acaccg 26

45
 <210> 6
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

50
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

24
 <400> 6
 gttctgttat tgacacccgc aatt

55
 <210> 7
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 7

5 ccttcctaataat aatcctgcgg atgt

24

<210> 8

<211> 28

10 <212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

15

<400> 8

ctgaaggtag cattagtctt tgataacg

28

20

SIRS-Lab GmbH
Anwaltsakte: PAT 3696/029

5. März 2004
H/18/kt

Zusammenfassung

- 5 Beschrieben wird ein Protein, das nicht methylierte CpG-Motive bindet, wobei es eine 25%ige bis 35%ige Homologie zum Wildtyp-CGPB-Protein aufweist und gegenüber diesem verkürzt ist, wobei die Bindungsstelle für nicht methylierte CpG-Motive erhalten ist. Des weiteren betrifft die Anmeldung ein Verfahren zur Trennung und/oder Anreicherung prokaryonten DNA mit den Schritten a) Kontaktieren mindestens einer in Lösung befindlichen prokaryonten DNA mit einem erfindungsgemäßen Protein, wodurch ein Protein-DNA-Komplex gebildet wird, und b)
- 10 Separation des Komplexes.

1/10

	10	20	30	40	50	
CPGbpP656	1	MEGDGSDPEP	PDAGEDSKSE	NGENAPIYCI	CRKPDINCFM	IGCDNCNEWF
CPGbpP241	1	-----	-----	-----	-----	-----
CPGbpP181	1	-----	-----	-----	-----	-----
	60	70	80	90	100	
CPGbpP656	51	HGDCIRITEK	MAKAIREWYC	RECREKDPKL	EIRYRHKKSR	ERDGNERDSS
CPGbpP241	51	-----	-----	-----	-----	-----
CPGbpP181	51	-----	-----	-----	-----	-----
	110	120	130	140	150	
CPGbpP656	101	EPRDEGGGRK	RPVPDENLQR	RAGSGTGVGA	MLARGSASPH	KSSPQPLVAT
CPGbpP241	101	-----GGGRK	RPVPDENLQR	RAGSGTGVGA	MLARGSASPH	KSSPQPLVAT
CPGbpP181	101	-----GGGRK	RPVPDENLQR	RAGSGTGVGA	MLARGSASPH	KSSPQPLVAT
	160	170	180	190	200	
CPGbpP656	151	PSQHHQOOQQ	QIKRSARMCG	ECEACRRTED	CGHCDFCRDM	KKFGGPNKIR
CPGbpP241	151	PSQHHQOOQQ	QIKRSARMCG	ECEACRRTED	CGHCDFCRDM	KKFGGPNKIR
CPGbpP181	151	PSQHHQOOQQ	QIKRSARMCG	ECEACRRTED	CGHCDFCRDM	KKFGGPNKIR
	210	220	230	240	250	
CPGbpP656	201	QKCLRQOQQL	RARESYKYFP	SSLSPVTPSE	SLPRRRRPLP	TQQQPQPSQK
CPGbpP241	201	QKCLRQOQQL	RARESYKYFP	SSLSPVTPSE	SLPRRRRPLP	TQQQPQPSQK
CPGbpP181	201	QKCLRQOQQL	RARESYKYFP	SSLSPVTPSE	SLPRRRRPLP	TQQQPQPSQK
	260	270	280	290	300	
CPGbpP656	251	LGRIREDEGA	VASSTVKEPP	EATATPEPLS	DEDLPLDPL	YQDFCAGAFD
CPGbpP241	251	LGRIREDEGA	VASSTVKEPP	EATATPEPLS	DEDLPLDPL	YQDFCAGAFD
CPGbpP181	251	LGRIREDEGA	VASSTVKEPP	EATATPEPLS	DEDLPL----	-----
	310	320	330	340	350	
CPGbpP656	301	DNGLPWMSDT	EESPFLDPAL	RKRAVKVKHV	KRREKKSEKK	KEERYKRRHQ
CPGbpP241	301	DNGLPWMSDT	EESPFLDPAL	RKRAVKVKHV	KRREKKSEKK	KEERYK----
	360	370	380	390	400	
CPGbpP656	351	KQKHKDKWKH	PERADAKDPA	SLPQCLGPGC	VRPAQPSSKY	CSDDCGMKLA
	410	420	430	440	450	
CPGbpP656	401	ANRIYEILPQ	RIQQWQQSPC	IAEEHGKKLL	ERIRREQQSA	RTRLQEMERR
	460	470	480	490	500	
CPGbpP656	451	FHELEAILLR	AKQQAVREDE	ESNEGDSDDT	DLQIFCVSCG	HPINPRVALR
	510	520	530	540	550	
CPGbpP656	501	HMERCYAKYE	SQTSFGSMYP	TRIEGATRLF	CDVYNPQSKT	YCKRLQVLCP
	560	570	580	590	600	
CPGbpP656	551	EHSRDPKVPA	DEVCGCPLVR	DVFELTGDFC	RLPKRQCNRH	YCWEKLRAE
	610	620	630	640	650	
CPGbpP656	601	VDLERVRVWY	KLDELFEQER	NVRTAMTNRA	GLLALMLHQT	IQHDPLTTDL
	660	670	680	690	700	
CPGbpP656	651	RSSADR....

Fig. 1

Fig. 2

5'	ATG	GAG	9 GGA	GAT	GGT	18 TCA	GAC	CCA	27 GAG	CCT	CCA	36 GAT	GCC	GGG	45 GAG	GAC	AGC	54 AAG
	M	E	G	D	G	S	D	P	E	P	P	D	A	G	E	D	S	K
	TCC	GAG	63 AAT	GGG	GAG	72 AAT	GCG	CCC	81 ATC	TAC	TGC	90 ATC	TGC	CGC	99 AAA	CCG	GAC	108 ATC
	S	E	N	G	E	N	A	P	I	Y	C	I	C	R	K	P	D	I
	AAC	TGC	117 TTC	ATG	ATC	126 GGG	TGT	GAC	135 AAC	TGC	AAT	144 GAG	TGG	TTC	153 CAT	GGG	GAC	162 TGC
	N	C	F	M	I	G	C	D	N	C	N	E	W	F	H	G	D	C
	ATC	CGG	171 ATC	ACT	GAG	180 AAG	ATG	GCC	189 AAG	GCC	ATC	198 CGG	GAG	TGG	207 TAC	TGT	CGG	216 GAG
	I	R	I	T	E	K	M	A	K	A	I	R	E	W	Y	C	R	E
	TGC	AGA	225 GAG	AAA	GAC	234 CCC	AAG	CTA	243 GAG	ATT	CGC	252 TAT	CGG	CAC	261 AAG	AAG	TCA	270 CGG
	C	R	E	K	D	P	K	L	E	I	R	Y	R	H	K	K	S	R
	GAG	CGG	279 GAT	GGC	AAT	288 GAG	CGG	GAC	297 AGC	AGT	GAG	306 CCC	CGG	GAT	315 GAG	GGT	GGA	324 GGG
	E	R	D	G	N	E	R	D	S	S	E	P	R	D	E	G G	G G	G G
	CGC	AAG	333 AGG	CCT	GTC	342 CCT	GAT	CCA	351 AAC	CTG	CAG	360 CGC	CGG	GCA	369 GGG	TCA	GGG	378 ACA
	R	K	R	P	V	P	D	P	N	L	Q	R	R	A	G	S	G	T
	R	K	R	P	V	P	D	P	N	L	Q	R	R	A	G	S	G	T
	GGG	GTT	387 GGG	GCC	ATG	396 CTT	GCT	CGG	405 GGC	TCT	GCT	414 TCG	CCC	CAC	423 AAA	TCC	TCT	432 CCG
	G	V	G	A	M	L	A	R	G	S	A	S	P	H	K	S	S	P
	G	V	G	A	M	L	A	R	G	S	A	S	P	H	K	S	S	P
	CAG	CCC	441 TTG	GTG	GCC	450 ACA	CCC	AGC	459 CAG	CAT	CAC	468 CAG	CAG	CAG	477 CAG	CAG	CAG	486 ATC
	Q	P	L	V	A	T	P	S	Q	H	H	Q	Q	Q	Q	Q	Q	I
	Q	P	L	V	A	T	P	S	Q	H	H	Q	Q	Q	Q	Q	Q	I
	AAA	CGG	495 TCA	GCC	CGC	504 ATG	TGT	GGT	513 GAG	TGT	GAG	522 GCA	TGT	CGG	531 CGC	ACT	GAG	540 GAC
	K	R	S	A	R	M	C	G	E	C	E	A	C	R	R	T	E	D
	K	R	S	A	R	M	C	G	E	C	E	A	C	R	R	T	E	D

Fig. 2 (Fortsetzung)

549			558			567			576			585			594		
TGT	GGT	CAC	TGT	GAT	TTC	TGT	CGG	GAC	ATG	AAG	AAG	TTC	GGG	GGC	CCC	AAC	AAG
C	G	H	C	D	F	C	R	D	M	K	K	F	G	G	P	N	K
C	G	H	C	D	F	C	R	D	M	K	K	F	G	G	P	N	K
603			612			621			630			639			648		
ATC	CGG	CAG	AAG	TGC	CGG	CTG	CGC	CAG	TGC	CAG	CTG	CGG	GCC	CGG	GAA	TCG	TAC
I	R	Q	K	C	R	L	R	Q	C	Q	L	R	A	R	E	S	Y
I	R	Q	K	C	R	L	R	Q	C	Q	L	R	A	R	E	S	Y
657			666			675			684			693			702		
AAG	TAC	TTC	CCT	TCC	TCG	CTC	TCA	CCA	GTG	ACG	CCC	TCA	GAG	TCC	CTG	CCA	AGG
K	Y	F	P	S	S	L	S	P	V	T	P	S	E	S	L	P	R
K	Y	F	P	S	S	L	S	P	V	T	P	S	E	S	L	P	R
711			720			729			738			747			756		
CCC	CGC	CGG	CCA	CTG	CCC	ACC	CAA	CAG	CAG	CCA	CAG	CCA	TCA	CAG	AAG	TTA	GGG
P	R	R	P	L	P	T	Q	Q	Q	P	Q	P	S	Q	K	L	G
P	R	R	P	L	P	T	Q	Q	Q	P	Q	P	S	Q	K	L	G
765			774			783			792			801			810		
CGC	ATC	CGT	GAA	GAT	GAG	GGG	GCA	GTG	GCG	TCA	TCA	ACA	GTC	AAG	GAG	CCT	CCT
R	I	R	E	D	E	G	A	V	A	S	S	T	V	K	E	P	P
R	I	R	E	D	E	G	A	V	A	S	S	T	V	K	E	P	P
819			828			837			846			855			864		
GAG	GCT	ACA	GCC	ACA	CCT	GAG	CCA	CTC	TCA	GAT	GAG	GAC	CTA	CCT	CTG	GAT	CCT
E	A	T	A	T	P	E	P	L	S	D	E	D	L	P	L	D	P
E	A	T	A	T	P	E	P	L	S	D	E	D	L	P	L	D	P
873			882			891			900			909			918		
GAC	CTG	TAT	CAG	GAC	TTC	TGT	GCA	GGG	GCC	TTT	GAT	GAC	AAT	GGC	CTG	CCC	TGG
D	L	Y	Q	D	F	C	A	G	A	F	D	D	N	G	L	P	W
927			936			945			954			963			972		
ATG	AGC	GAC	ACA	GAA	GAG	TCC	CCA	TTC	CTG	GAC	CCC	GCG	CTG	CGG	AAG	AGG	GCA
M	S	D	T	E	E	S	P	F	L	D	P	A	L	R	K	R	A
981			990			999			1008			1017			1026		
GTG	AAA	GTG	AAG	CAT	GTG	AAG	CGT	CGG	GAG	AAG	AAG	TCT	GAG	AAG	AAG	AAG	GAG
V	K	V	K	H	V	K	R	R	E	K	K	S	E	K	K	K	E
1035			1044			1053			1062			1071			1080		
GAG	CGA	TAC	AAG	CGG	CAT	CGG	CAG	AAG	CAG	AAG	CAC	AAG	GAT	AAA	TGG	AAA	CAC
E	R	Y	K	R	H	R	Q	K	Q	K	H	K	D	K	W	K	H
1089			1098			1107			1116			1125			1134		
CCA	GAG	AGG	GCT	GAT	GCC	AAG	GAC	CCT	GCG	TCA	CTG	CCC	CAG	TGC	CTG	GGG	CCC
P	E	R	A	D	A	K	D	P	A	S	L	P	Q	C	L	G	P

Fig. 2 (Fortsetzung)

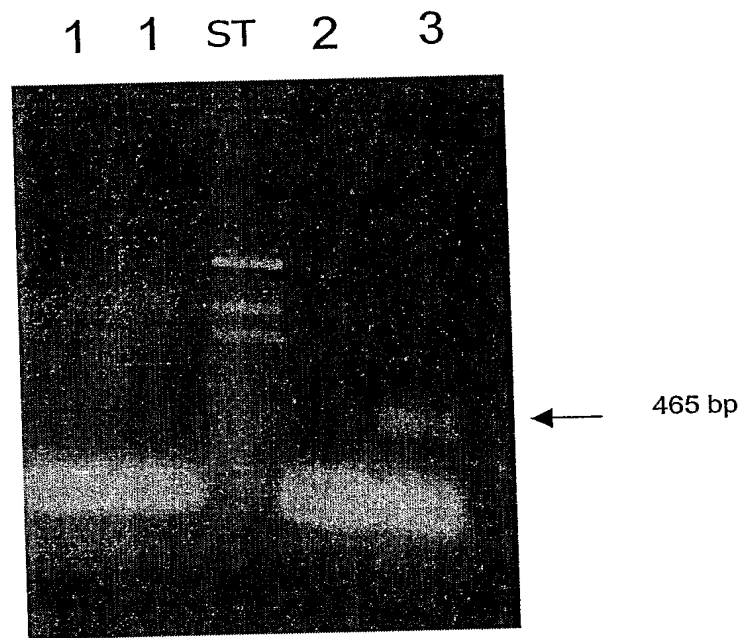
1143	1152	1161	1170	1179	1188
GGC TGT GTG CGC CCC GCC CAG CCC AGC TCC AAG TAT TGC TCA GAT GAC TGT GGC					
G C V R P A Q P S S K Y C S D D C G					
1197	1206	1215	1224	1233	1242
ATG AAG CTG GCA GCC AAC CGC ATC TAC GAG ATC CTC CCC CAG CGC ATC CAG CAG					
M K L A A N R I Y E I L P Q R I Q Q					
1251	1260	1269	1278	1287	1296
TGG CAG CAG AGC CCT TGC ATT GCT GAA GAG CAC GGC AAG AAG CTG CTC GAA CGC					
W Q Q S P C I A E E H G K K L L E R					
1305	1314	1323	1332	1341	1350
ATT CGC CGA GAG CAG CAG AGT GCC CGC ACC CGC CTT CAG GAA ATG GAA CGC CGA					
I R R E Q Q S A R T R L Q E M E R R					
1359	1368	1377	1386	1395	1404
TTC CAT GAG CTT GAG GCC ATC ATT CTA CGT GCC AAG CAG CAG GCT GTG CGC GAG					
F H E L E A I I L R A K Q Q A V R E					
1413	1422	1431	1440	1449	1458
GAT GAG GAG AGC AAC GAG GGT GAC AGT GAT GAC ACA GAC CTG CAG ATC TTC TGT					
D E E S N E G D S D D T D L Q I F C					
1467	1476	1485	1494	1503	1512
GTT TCC TGT GGG CAC CCC ATC AAC CCA CGT GTT GCC TTG CGC CAC ATG GAG CGC					
V S C G H P I N P R V A L R H M E R					
1521	1530	1539	1548	1557	1566
TGC TAC GCC AAG TAT GAG AGC CAG ACG TCC TTT GGG TCC ATG TAC CCC ACA CGC					
C Y A K Y E S Q T S F G S M Y P T R					
1575	1584	1593	1602	1611	1620
ATT GAA GGG GCC ACA CGA CTC TTC TGT GAT GTG TAT AAT CCT CAG AGC AAA ACA					
I E G A T R L F C D V Y N P Q S K T					
1629	1638	1647	1656	1665	1674
TAC TGT AAG CGG CTC CAG GTG CTG TGC CCC GAG CAC TCA CGG GAC CCC AAA GTG					
Y C K R L Q V L C P E H S R D P K V					
1683	1692	1701	1710	1719	1728
CCA GCT GAC GAG GTA TGC GGG TGC CCC CTT GTA CGT GAT GTC TTT GAG CTC ACG					
P A D E V C G C P L V R D V F E L T					
1737	1746	1755	1764	1773	1782
GGT GAC TTC TGC CGC CTG CCC AAG CGC CAG TGC AAT CGC CAT TAC TGC TGG GAG					
G D F C R L P K R Q C N R H Y C W E					

Fig. 2 (Fortsetzung)

1791				1800			1809			1818			1827			1836		
AAG	CTG	CGG	CGT	GCG	GAA	GTG	GAC	TTG	GAG	CGC	GTG	CGT	GTG	TGG	TAC	AAG	CTG	
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
K	L	R	R	A	E	V	D	L	E	R	V	R	V	W	Y	K	L	
1845				1854			1863			1872			1881			1890		
GAC	GAG	CTG	TTT	GAG	CAG	GAG	CGC	AAT	GTG	CGC	ACA	GCC	ATG	ACA	AAC	CGC	GCG	
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
D	E	L	F	E	Q	E	R	N	V	R	T	A	M	T	N	R	A	
1899				1908			1917			1926			1935			1944		
GGA	TTG	CTG	GCC	CTG	ATG	CTG	CAC	CAG	ACG	ATC	CAG	CAC	GAT	CCC	CTC	ACT	ACC	
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
G	L	L	A	L	M	L	H	Q	T	I	Q	H	D	P	L	T	T	
1953				1962			1971											
GAC	CTG	CGC	TCC	AGT	GCC	GAC	CGC	TGA	3'									
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---									
D	L	R	S	S	A	D	R	*										

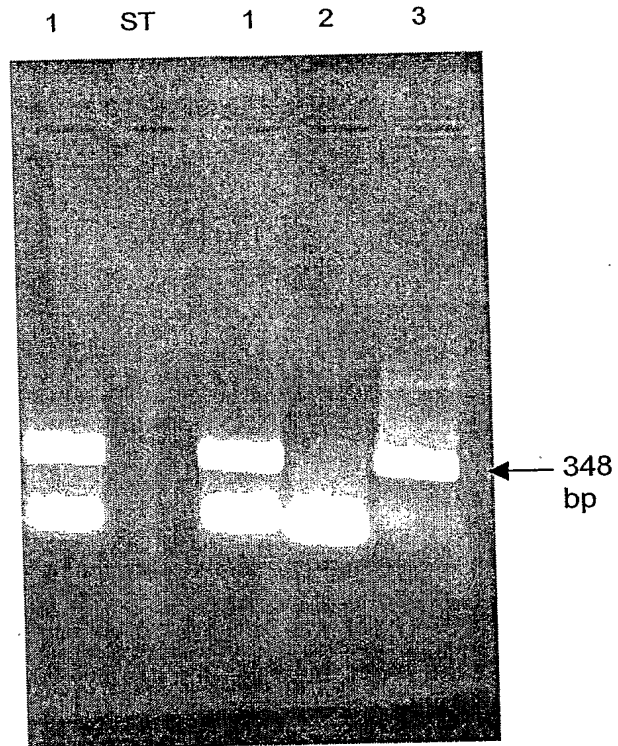
6/10

Fig. 3



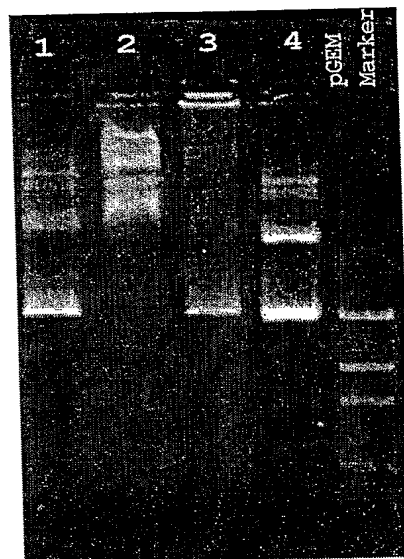
7/10

Fig. 4



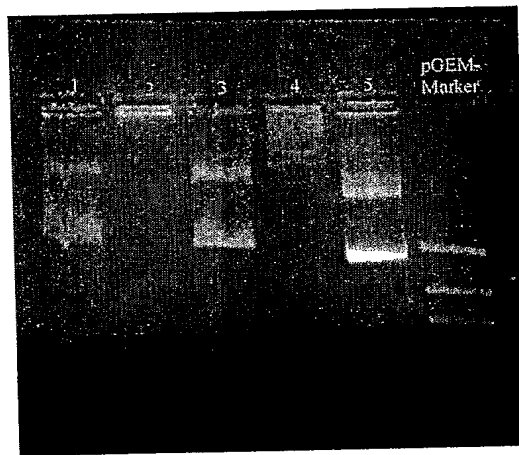
8/10

Fig. 5



9/10

Fig. 6



10/10

Fig. 7

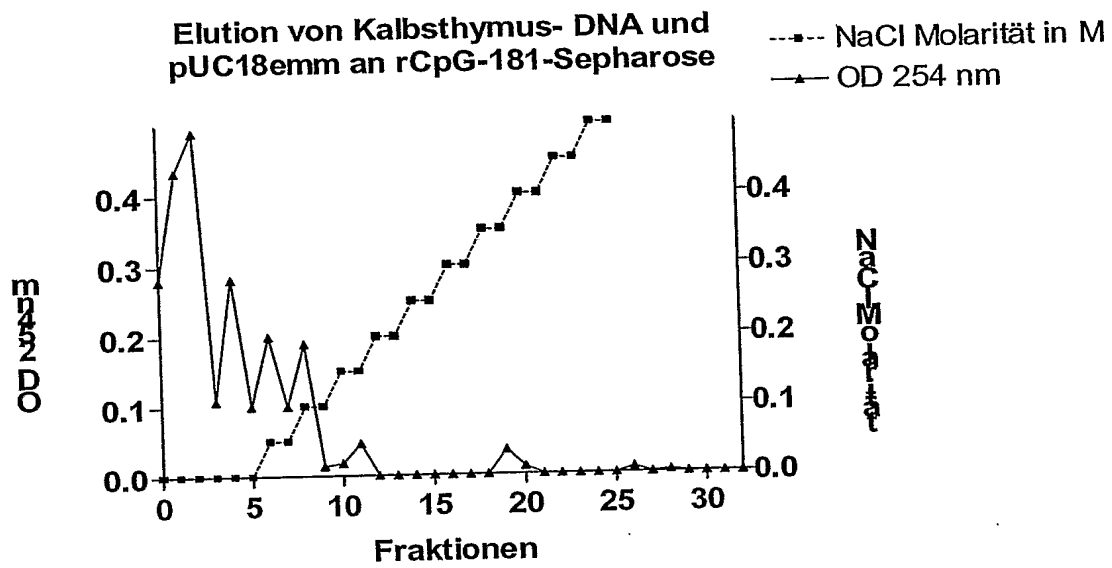


Fig. 8

